DOI:10.13523/j.cb.20170720

微藻生物质成分检测方法评述*

孟迎迎[1,2]　姚长洪[1]　刘　娇[1,3]　申培丽[1,3]　薛　松[1]**　杨　青[2]

(1 中国科学院 大连化学物理研究所 海洋生物工程组　大连　116023)

(2 大连理工大学生命科学与技术学院　大连　116024　3 中国科学院大学　北京　100084)

摘要　不断发展的微藻产业需要统一可信的生物质检测方法体系来评估微藻研究、培养及生产中的各种生物质指标。对目前常用的微藻生物质组成的检测方法进行综述及评估,以期推动微藻产业的生物质分析平台标准化。

关键词　微藻生物质检测方法　脂质　色素　碳水化合物　蛋白质

中图分类号　[Q815]

微藻光合作用效率高、生长周期短、不占用耕地以及细胞中含有油脂、蛋白质、碳水化合物及类胡萝卜素等物质,使其在生物能源、环境、食品和医药领域具有巨大的潜力。目前微藻产业研究主要集中于微藻生物能源技术开发[1-2]和基于高附加值产品微藻产业化开发[3-4]。应用于研究的微藻分为两类:①用于生物能源的富含甘油三酯(TAG)和淀粉(糖原)的微藻:微拟球藻、亚心型四爿藻、螺旋藻等[5-7];②富含蛋白质、多糖、色素、多不饱和脂肪酸等营养物的高附加值微藻:螺旋藻、杜氏盐藻、小球藻、雨生红球藻、金藻等[8-13]。在微藻生物技术发展过程中,借鉴及发展了多样的生物质成分检测分析方法,而不同方法测定的结果差别较大,这使得不同实验室公布的数据可比性小,影响和限制了微藻代谢研究与微藻生物质产业的发展。因此不断发展的微藻产业需要标准可信的生物质检测方法体系来评估微藻研究及生产等环节中的各种生物质指标。本文主要从微藻脂质、色素、蛋白质、多糖测定方法及高通量全组分分析方法等方面对目前微藻研究中常用的成分检测方法进行全面综述及评价,以期能够对微藻生物质的研究开发以及分析方法标准化起到推动作用。

收稿日期:2017-01-29　　修回日期:2017-03-01

* 国家"863"计划(2014AA022004)、国家自然科学基金(41406177,21576253,31470432)资助项目

**通讯作者,电子信箱:xuesong@dicp.ac.cn

1　脂质的分析

微藻生物能源以脂质研究为中心。确定不同状态下微藻各类脂质含量及脂肪酸组成可为深入研究储能脂质的积累及代谢机制提供基本信息。因此良好的脂质分析平台可为微藻脂质的研究提供准确的基础数据。

1.1　总脂含量测定

脂质提取为脂质分析的第一步。脂质广义的定义是指不溶于水,溶于有机溶剂的物质。因此脂类的极性范围较大,根据相似相容原理,不同的提取溶剂体系所提取的脂类物质不同,脂质提取溶剂体系的极性差异可直接影响所测定脂质的含量。常用的微藻总脂的提取溶剂体系主要有氯仿-甲醇(2∶1 V/V)[14]、氯仿-甲醇-水(2∶2∶1.8 $V/V/V$)[15]、正己烷及正己烷-异丙醇(3∶2 V/V)[16]。利用固相萃取柱(SPE)将上述4种溶剂体系提取的总脂进一步分离为中性脂、糖脂及磷脂[5](图1),进一步认识四种溶剂体系提取脂质的差异。结果显示,氯仿-甲醇体系提取的总脂含量最高,其中磷脂部分含量高于其他的提取溶剂体系,但将提取物氮气吹干后不能全部溶于氯仿,说明氯仿-甲醇体系的提取物质中掺杂有非脂类的极性物质;正己烷溶剂极性小,提取的脂质以中性脂为主,丢失了部分糖脂及磷脂;氯仿-甲醇-水及正己烷-异丙醇体系提取总脂含量相近,但正己烷-异丙醇体系易与藻泥中的水在一定比例范围内不互溶,造成提取不方便。通过上述对提

取方法的分析，由 Bligh 和 Dyer[15] 提出的氯仿-甲醇-水(2:2:1.8 V/V/V)体系为最适合微藻总脂提取的溶剂体系。

传统的总脂含量测定方法采用溶剂提取后的重量法测定。油脂提取是否完全取决于提取溶剂体系与脂质的相溶性及细胞的破碎程度。此外，溶剂提取的总脂不可避免的包含非甘油脂类物质，如色素、甾醇类等。而且不同藻种及不同培养时期细胞壁的差异及脂质提取过程的繁琐操作通常导致所测定的含量差异较大。再者，微藻总脂测定的目的主要在于了解其含量及脂肪酸组成变化。因此越来越多的实验室采用藻细胞直接转酯化测定脂肪酸甲酯(FAME)的方法测定总脂肪酸含量，作为溶剂提取测定总脂的一种替代方法[17-18]。该方法不限于微藻种类、细胞的生理状态并且不包含脂质提取过程，是一种可标准化的甘油酯含量测定方法。测定过程包括酸催化转酯化及气相色谱(GC)定量 FAME 两个步骤。Liu 等[17] 发展了一种藻细胞直接转酯化方法，以硫酸作为催化剂，70℃ 下 1h 即可完成反应，再经正己烷萃取获得的 FAME 通过 GC 分析进行定量。该方法不仅样品用量小，且与溶剂提取方法相比，大大缩短了分析时间。

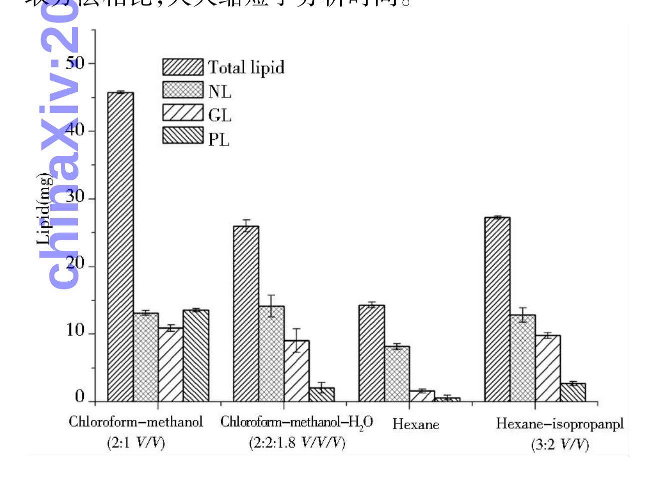


图 1 4 种溶剂体系提取总脂及组成的差别

Fig. 1 The total lipid content and composition distinction from four kinds of extraction methods

NL: Neutral lipid; GL: Glycolipid; PL: Phospholipid

1.2 荧光染料法高通量原位测定中性脂含量

富油藻种筛选是进行油脂代谢机制研究及规模化培养生产生物柴油的前提。油脂含量是藻种筛选的重要指标，因此快速、准确、简便的油脂含量测定方法对富油藻种的筛选极其重要。尼罗红(Nile red, NR)、BODIPY 505/515 等荧光染料可特异性的与微藻中性脂油滴结合而在特定波长下激发产生荧光，因此基于荧光分光光度计的快速测定微藻中性脂含量的方法在优良藻种筛选及微藻培养过程的脂质积累监测中得到广泛应用[19-21]。然而，常用的 NR、BODIPY 505/515 染料都有各自的缺点。尼罗红染料对不同藻种的细胞壁渗透性存在差异，导致染色效果差异大。此外，叶绿体等细胞组织的自发荧光会对尼罗红荧光的测定产生干扰[22]。BODIPY 505/515 与尼罗红荧光染料相比发射波谱范围较窄，不会受微藻自身荧光干扰，能够快速渗透细胞壁及组织细胞膜并与油脂结合，但 BODIPY 505/515 本身斯托克位移较小，因此在使用荧光分光光度计测定油脂含量时也有一定限制[22]。图 2 列出了 NR 及 BODIPY 的适用条件及获得最优染色效果的参数。基于尼罗红或 BODIPY 505/515 的高通量的定量方法可用于同一藻种内富油藻株的诱变或驯化筛选及群体间差异性分析，但由于不同藻种仅细胞壁及内部组织有差异，此方法难以应用于不同藻种间的差异比较。此外，值得注意的是基于荧光强度和脂质含量的标准曲线具有藻种特异性，不能通用于不同藻种间。

1.3 脂肪酸成分分析

基于气相色谱的微藻脂肪酸分析常被用于评估微藻油脂是否适合生产生物柴油，而更具有价值的是利用脂肪酸分析来精确定量各脂类的含量及其脂肪酸组成，应用于微藻油脂代谢相关分析。

1.3.1 各类脂质脂肪酸的定性、定量分析　在 1.1 部分提到全细胞的转酯化测定甘油酯含量避免了非甘油酯类物质的干扰，测定准确性高。而利用 SPE 或薄层色谱(TLC)将提取的总脂进行进一步分离，将获得的分离组分分别进行转酯化测定脂肪酸含量，此过程能够准确测定每类脂质的含量并确定其脂肪酸组成。例如，利用 SPE 将微藻总脂分为中性脂(NL)、糖脂(GL)、磷脂(PL，包括甜菜碱脂)三部分，将每部分脂质经转酯化和 GC 测定便可确定三大类脂质在总脂及细胞中所占的比例及各自的脂肪酸构成[5]。同样提取的总脂或 SPE 分离的脂质部分可利用 TLC 分离获得各类脂质组分(如 TAG、MGDG、PC 等)[5, 23]，通过转酯化反应和 GC 测定其脂肪酸甲酯的含量又可获得每一类脂质的含量及脂肪酸组成[5]。通过上述预分离-转酯化-GC 测定的方法能够完整的认识微藻脂质的构成，这能为研究微藻脂质代谢和认识胁迫条件下微藻 TAG 的积累机制提供重要基础。

荧光染料选择：尼罗红或 BODIPY

检测目标	检测仪器	染色剂选择
· 相对或绝对定量：尼罗红或 BODIPY · 可视的油滴成像：BODIPY 无荧光猝灭	· 荧光显微镜：尼罗红或 BODIPY · 荧光分光光度计：尼罗红 · 流戒细胞仪：尼罗红或 BODIPY	· 多数千藻对于染色剂为藻种依赖型，可通过文献数据选择染色剂 · 较厚细胞壁藻种建议使用 BODIPY

最优化染色参数

染色液准备及储存	细胞浓度	染色剂浓度
· 避光 · 分装存储于 −20℃，最久可存 30 天（避免荧光的消失） · 单次使用，避免重复冻存	· 线性浓度：一般最适的细胞浓度范围为 5×10^4~1×10^6 cell/ml	染色剂的浓度火藻种特异性的一般浓度范围： · 尼罗红：0.1~2μg/ml · BODIPY:0.04~0.26μg/ml
染色时间	**背景测定**	**染料渗透性测试**
· 最优的染色时间具有藻种特异性，一般在 5~15min。	· 尼罗红：未染色的样品溶液（扣除细胞的自发荧光及培养基荧光） · BODIPY：加入染色液的培养基（扣除培养基的染色荧光）	· 依据细胞壁缓刑成的差异，可通过增加 DMSO、甘油及物理处理法，增加染料的渗透性。

图 2　荧光染色法染色剂选择及最优染色参数[22]

Fig. 2　The choice of fluorescent staining and optimization of staining parameters

1.3.2　利用特征脂肪酸快速定量 TAG 的含量　强化 TAG 的合成是微藻生物能源领域的研究重点。各种环境胁迫(包括光照、营养盐、pH、盐度、温度等)为常用且有效的诱导 TAG 积累的手段。微藻培养过程需要监测 TAG 积累来计算 TAG 的产率,因此需要一种能够快速准确测定 TAG 含量的方法。虽然 1.3.1 中通过 TLC 分离-转酯化-GC 测定的方法能够进行 TAG 的测定,但此方法存在耗时长、样品需要量较大等问题。不同微藻的脂肪酸的构成具有特异性。但一般来说,多不饱和脂肪酸主要分布于极性甘油酯中,而饱和及单不饱和脂肪酸则富集于 TAG 中。通常胁迫条件下 TAG 的积累会伴随着极性甘油酯的减少,因此胁迫后 TAG 积累的含量可能与饱和脂肪酸呈正相关,而与多不饱和脂肪酸呈负相关。已有研究表明,微藻脂肪酸中存在特征脂肪酸,在一定范围内其变化与 TAG 含量呈线性相关,由此表征 TAG 积累的程度。例如,湛江等鞭金藻(*Isochrysis zhangjiangensis*)的脂肪酸 C18:1n9 和 C18:4n3 分别与中性脂含量程正相关、负相关,相关系数(R^2)分别为 0.996 0 和 0.978 7[18]。此外,三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)、微拟球藻(*Nannochloropsis oceanica*)、小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)中特征脂肪酸的含量与 TAG 积累也呈良好相关性(图 3)[24]。基于特征脂肪酸与 TAG 含量间良好的线性相关性,通过藻细胞直接转酯化-GC 测定细胞特征脂肪酸相对百分含量,来快速测定 TAG 的含量。这是一种"以点带面"的测定方法,实现快速准确测定 TAG 含量。

1.3.3　利用微通道反应器进行快速脂肪酸成分分析　常规的酸催化转酯化反应时间为 1h 左右,往往是脂肪酸成分分析的限速步骤。为实现快速脂肪酸成分分析,利用具有高效传质传热的微通道反应器进行微藻脂质的转酯化,可大大缩短转酯化时间,从而缩短脂肪酸成分分析时间。Liu 等[25]使用微通道反应器,建立了微通道内最低 30μg 油脂的快速转酯化方法,整个转酯化反应仅需 20min。最新研究可实现微藻新鲜藻细胞在微通道的直接转酯化。此工艺的建立大大简化了样品的前处理过程,为实现微藻培养过程中实时在线监测脂肪酸变化提供了可能。

1.4　脂质高效液相色谱(HPLC)分离及基于 HPLC/MS^n 的脂质分析

HPLC 技术被广泛应用在脂质分析中。HPLC 对甘油酯的分析包括正相色谱(NPLC)、亲水作用色谱(HILIC)对脂类的分离,以及反相色谱(RPLC)对脂质分子不同种类的分离。

正相及亲水分离模式主要利用脂质极性的差异进行各脂类的分离。NPLC 主要采用硅胶柱和二醇基柱分别对中性脂和极性脂进行分离[26]。HILIC 是近年发展起来的一种色谱分离模式,使用 RPLC 常用的乙腈、甲醇、水等作为流动相,改善了 NPLC 对脂类的分离必

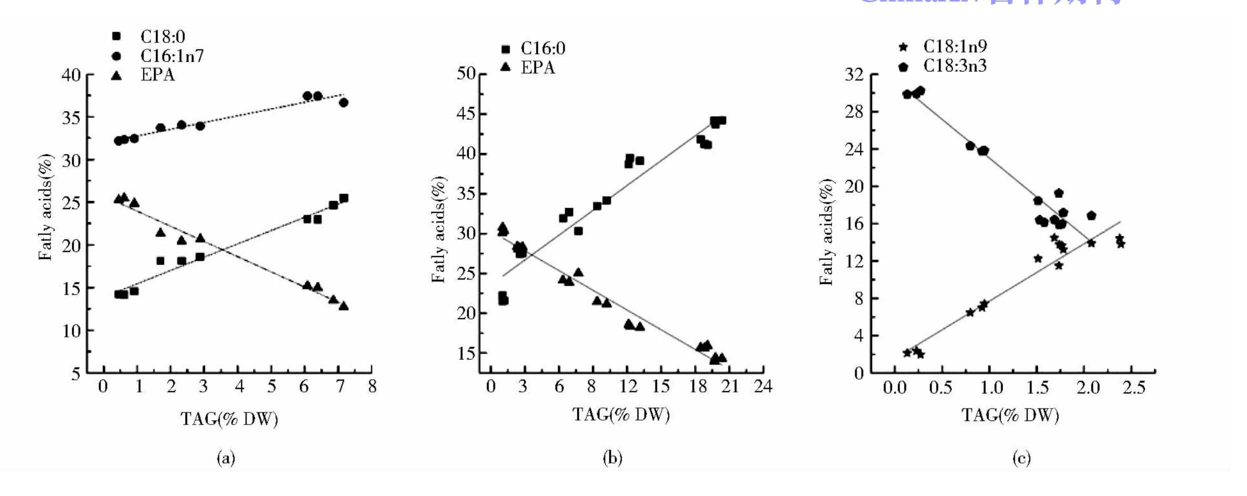


图 3 三株产油微藻与 TAG 含量的线性相关性[24]

Fig. 3 Correlations between characteristic fatty acids and triacylglycerol (TAG) content in *P. tricornutum* (a), *N. oceanica* IMET1 (b) and *C. pyrenoidosa* (c)

(a) C16:0, C16:1n7 and EPA were determined to be characteristic fatty acids in *P. tricornutum*, the correlation coefficients of C16:0, C16:1n7 and EPA with TAG content were 0.96, 0.94 and 0.97, respectively (b) C16:0 and EPA were determined to be characteristic fatty acids in *N. oceanica*, the correlation coefficients of C16:0 and EPA with TAG content were 0.94 and 0.97, respectively (c) C18:1 and C18:3 were determined to be characteristic fatty acids in *C. pyrenoidosa*, the correlation coefficients of C18:1 and C18:3 with TAG content were 0.91 and 0.99, respectively

须使用无水的低极性溶剂体系的缺点,使得 HILIC 与质谱具有更好的兼容性。利用 HILIC 对微藻及植物中的糖脂、磷脂和甜菜碱脂分离分析已有报道[27-28]。NPLC 或 HILIC 可对脂类进行定量测定,一般采用蒸发光散射检测器(ELSD)作为检测器[29]。ELSD 是一种通用型质量检测器,可以用于无紫外吸收的脂类检测。但 ELSD 存在易受测定环境影响及重复性差的问题,而致使 HPLC 对脂类定量测定使用较少。

RPLC 对脂质分子的分离一般采用 C18 柱或 C8 柱,依据脂质分子酰基链的长度及所含双键的数目对脂质分子进行分离。脂质分子在反相色谱柱的保留基本符合等价碳原子数规律(equivalent carbon number,脂质分子保留时间顺序等于酰基链总的碳原子数减 2 倍的双键数)[30],即等价碳原子数相同的脂质分子保留时间相近,等价碳原子数越大其在反相柱的保留越强。一般微藻中的脂质分子数目较多(>100 个),RPLC 下对脂质的分离存在峰的交叉或重叠。因此基于 RPLC 的脂质分离一般以质谱为检测器进行脂质分子种类及结构的分析。

基于液相色谱串联电喷雾质谱(HPLC-ESI-MS/MS)的高通量脂质分子的定性定量分析,可提供完整的微藻脂质种类组成及脂质分子酰基链信息,是脂质代谢及功能研究的有力工具。靶向的脂质分析首先是对各脂类分子组成进行确定,可利用三重四级杆质谱(QQQ)或串联四级杆线性离子阱质谱(QTRAP)中的前体离子扫描(PIS)或中性丢失扫描(NL)对糖脂、磷脂及甜菜碱脂的脂质分子进行辨认[28],多次中性丢失扫描对 TAG 分子进行确认[31]。而 QTRAP 中 PIS/NL-IDA-EPI 模式可同时对脂质分子和酰基链辨认,但此方法对低含量的脂质分子酰基链的辨认率较低。多级反应监测扫描(MRM)可对已确认的脂质分子进行定量或半定量分析[32]。非靶向的脂质分析研究主要采用具有高的分辨率及分析稳定性[33]的 Q-TOF 质谱,但 Q-TOF 也存在二级质谱对酰基链辨认率低的缺点。脂质分子酰基链的快速高通量确定可通过线性离子阱-静电场轨道阱质谱(LTQ-Orbitrap)进行分析,利用其二级或三级碎片信息确认每一个脂质分子酰基链构成。目前微藻脂质分子的数据主要用于以下方面的研究:①认识微藻脂质组成全貌;②脂质代谢途径研究;③胁迫条件对脂质组成的影响;④分析与脂质相关的特定基因及酶的功能。

2 微藻色素分析

2.1 叶绿素及类胡萝卜素测定

叶绿素的测定主要采用分光光度计法,利用混合

叶绿素含量的计算公式计算叶绿素含量。Ritchie 报道了具有代表的叶绿素组成分别为 chla、chla + chlb、chla + $chlc_2$、chla + $chlc_1$ + c_2 的蓝藻(*Cyanobacteria*)、绿藻(*Chlorophyte*)、甲藻(*Dinophyte*)、硅藻(*Diatom*)及 *Acaryochloris marina* 在分别以 90% 丙酮、甲醇及乙醇作为提取溶剂时叶绿素的计算公式[34],以及通用性叶绿素计算公式可用于混合藻叶绿素 a、b、c、d 以及总叶绿素含量的计算[35],并讨论了基于分光光度法的叶绿素测定过程中的统计误差结构。上述报道系统地研究了微藻叶绿素的计算公式,能够满足不同微藻及混合培养微藻的叶绿素分析的要求。

微藻中类胡萝卜素的测定根据分析目的不同可分为分光光度法及 HPLC 法。分光光度法主要是估算类胡萝卜素总量,虽然不同微藻中类胡萝卜素组成具有差异,但最大吸收波长均在 470 ~490nm,因此分光光度法能用于快速测定微藻中类胡萝卜素总量[36]。当需要对微藻中类胡萝卜素单一组分分析时,一般采用 HPLC 法进行分离定性及定量。Rodríguez-Bernaldo de Quirós 和 Costa[37]综述了类胡萝卜素的样品提取、皂化及基于 HPLC 分离的色谱条件。Van Heukelem 和 Thomas[38]报道了 HPLC 分离微拟球藻、金藻、杜氏盐藻、甲藻等 12 种微藻光合色素的方法。Guaratini 等[39]也报道了基于 C30 色谱柱下扁藻、金藻、甲藻等 6 株藻光合色素的 HPLC 分离。值得注意的是,由于不同藻种间光合色素的组成差异大,针对不同的微藻要进行色谱分离条件的优化,避免峰重叠对分析的干扰。

2.2　虾青素的测定

微藻来源的虾青素受到越来越多的关注。单细胞绿藻雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)能在胁迫条件下诱导积累虾青素,其虾青素的积累量可达藻细胞干重的 1.0% ~4.0%,因而被公认为是天然虾青素的最佳生物来源。雨生红球藻中的虾青素具有 3S,3′S 全反式手性结构,主要以虾青素单酯形式存在,另含有少量游离虾青素及虾青素双酯。全反式虾青素不稳定,在提取测定过程中容易受热、光、金属离子等影响转变为 9-*cis* 和 13-*cis* 虾青素。

雨生红球藻中虾青素含量的测定可采用分光光度法或 HPLC 法。分光光度法首先利用 5% KOH-30% 甲醇溶液加热 10min 左右破坏叶绿素,然后二甲基亚砜(DMSO)提取虾青素,OD_{475nm}测定其吸光度值以计算虾青素浓度[40]。此方法能够快速估算虾青素含量,在培养及生产中应用较多。HPLC 法根据样品的处理方式不同可分为两种,一种为提取的色素样品不经前处理直接通过 HPLC 或 HPLC/MS 测定[41],避免了皂化过程中虾青素的降解,而且可实现虾青素、虾青素酯、其他类胡萝卜素及叶绿素的同时测定,在虾青素成分确定及虾青素代谢机制研究中具有一定应用[42],但分析测定耗时长且分离要求高。另一种方法为虾青素酯经皂化或酶解前处理后进行 HPLC 测定,将虾青素酯转变为虾青素,HPLC 对虾青素分离及定量。此方法可简化样品的组成,使 HPLC 分析更加简单。目前虾青素测定的国标 GB/T 31520-2015 是采用皂化后 HPLC 测定的方法①。但此方法的皂化条件苛刻,皂化过程中碱溶液的浓度、皂化温度及时间均会影响皂化的效率及虾青素的稳定性。酶解法作为一种温和的水解方式被生产虾青素的国内外公司应用,所使用的胆固醇酯酶不仅能够完全水解虾青素酯,而且不易造成虾青素的氧化,可以更加准确的确定虾青素的含量。

3　微藻碳水化合物测定

微藻碳水化合物主要以多糖的形式存在于细胞中,包括以葡萄糖为单糖基的淀粉(如莱茵衣藻、亚心形四爿藻等绿藻)、糖原(如螺旋藻、集胞藻等蓝藻)、昆布多糖(如金藻、微拟球藻)、纤维素和掺有其他单糖(如半乳糖、果糖、鼠李糖、岩藻糖、甘露糖、阿拉伯糖、木糖等)的多糖。

传统的总碳水化合物含量测定方法主要有硫酸-苯酚法[43]、硫酸-蒽酮法[44]等。此两种方法均可以直接测定单糖、寡糖和多聚糖,测定成本低、速度快,在 30min 内即可完成测定,且微藻样品用量较少,5mg 以内即可分析。然而它们的缺点在于不同的单糖与苯酚或蒽酮试剂的显色深度有较大差异,如果以单一的糖类(如葡萄糖)作为标准品进行校正,会在含较多非葡萄糖基的测定中造成较大误差[45]。因此,此两种方法适用于单一糖类占优势的总碳水化合物含量的快速测定。此外,硫酸-苯酚法对操作的要求比硫酸-蒽酮法更加严格,浓硫酸加入方式对显色有很大影响,而硫酸-蒽酮法操作相对简便,准确度高,是较为理想的微藻总碳水化合物测定方法。

近年来发展了利用 GC 或 HPLC 方法分析微藻总

---

① GB/T 31520-2015 红球藻中虾青素的测定液相色谱法

糖和各单糖比例的方法,可以排除不同单糖的影响,从而较准确的获得总糖含量。微藻多糖经过水解成单糖后,可采用糖腈或糖醇衍生化 - GC[46-47]、PMP 衍生化 - HPLC[48]、直接 HPLC[47,49] 等方法进行检测。GC 检测单糖的分辨率较 HPLC 更高,分离效果更好,但所需衍生化时间较长,操作相对复杂,衍生化产物不稳定[47]。总体来讲,利用色谱检测碳水化合物的方法操作步骤较多,耗时较长,需要复杂精密的仪器设备,因此测定成本较高,适用于需要精确定量的碳水化合物测定。

淀粉作为绿藻和部分红藻光合固碳的积累物,在生物能源、生物材料等领域有广泛的应用[50]。微藻淀粉是由葡萄糖通过 α-1,4 糖苷键和少量 α-1,6 糖苷键连接组成的多糖[51],因此其测定通常经历"水解 - 葡萄糖测定"两步。淀粉水解的方法包括酸水解和酶水解[52]。酸水解主要是由 30% 高氯酸[53]或稀盐酸①完成,其水解较为彻底,但专一性较差,非淀粉类的寡糖或多糖也将被水解为单糖,随后由化学法(如硫酸-蒽酮法[53])测定葡萄糖,致使测定结果偏大,因此仅适用于淀粉为主要碳水化合物时(如绿藻营养限制下淀粉大量积累[53])的测定。为了提高淀粉水解的专一性,目前普遍采用酶水解的方法,即在高温糊化后,由 α-淀粉酶、α-淀粉葡萄糖苷酶等[52]水解糖苷键得到单体葡萄糖,但此法获得的产物除了葡萄糖外还可能存在水解不完全的可溶性低聚糖,如果后续步骤中以酶法(如 GOPOD 法[52]、NADH 酶偶联法[54])或者 HPLC 法专一地测定葡萄糖[45],将导致结果偏小。为了保证水解不完全的可溶性低聚糖与葡萄糖均被测到,可以采用化学法(如硫酸-蒽酮法)测定酶水解产物中的可溶性总糖,即采用"酶法水解 - 化学法测可溶性总糖"的策略,提高淀粉测定的准确性。

4 微藻蛋白质测定

微藻蛋白质含量是评价微藻生物质品质的重要指标。微藻蛋白质含量的测定方法包括化学比色法、N 含量换算法和氨基酸组成加合法。化学比色法通常是将微藻生物质置于碱性条件下(如 0.5mol/L NaOH[55]),使蛋白质完全可溶,再通过常规的 Lowry 法[56]、Bradford 法[57]、BCA 法[58]等进行蛋白质的测定。此法无需复杂的仪器设备,操作简便快速,缺点在于影响检测准确性的因素较多。例如,蛋白质的溶解程度直接影响蛋白质总量的测定;微藻细胞内其他非蛋白质干扰物质或提取液的干扰导致显色的偏差(如 Lowry 法、BCA 法);微藻蛋白质氨基酸组成与标准物质(如 BSA)的偏差将导致显色程度的差异(如 Bradford 法),影响蛋白质含量的确定,等等。因此,在具有不同氨基酸组成的不同微藻种间或者同种微藻在不同的培养条件下利用化学比色法测定的蛋白质含量可比性较差[45]。

N 含量换算法是利用元素分析仪或凯氏定氮仪测定微藻生物质 N 含量,再通过 N-蛋白质换算因子计算蛋白质含量。此法受到非蛋白质含 N 化合物(如核酸、叶绿素等)的干扰,但与化学比色法相比干扰的程度相对较少,目前正逐渐得到应用[45]。N 含量换算法的核心在于确定 N-蛋白质换算因子的大小。换算因子在不同的 N 含量测定方法和不同种类的微藻中不同。例如,以 Lowry 法测定的微藻蛋白质含量为标准,元素分析仪测定 N 含量对栅藻等绿藻和螺旋藻等蓝藻的蛋白质换算因子为 4.44,而凯氏定氮仪测定 N 对蛋白质的换算因子则为更高的 5.95[59]。Lourenço 等[60]通过分析 12 种不同微藻在不同培养条件下 N 含量与氨基酸含量的关系,得到 N-蛋白质换算因子平均在 4.78 ± 0.62。螺旋藻作为目前国内外产业化生产规模最大的微藻,其主要营养物质蛋白质的测定仍然借鉴食品中凯氏定氮法的 N-蛋白质换算因子 6.25②,由此可能使得测定结果高于实际蛋白质水平。因此在利用 N 含量换算法之前仍需对待测微藻体系作较为准确的换算因子评估。

氨基酸组成加合法被认为是目前最准确的蛋白质含量测定方法[45]。通过标准的酸水解(6mol/L HCl, 110℃, 18h)过程,将蛋白质水解成氨基酸,再通过 HPLC 分析氨基酸含量,回算蛋白质的总量。此法主要受蛋白质水解程度的影响。微藻生物质在水解之前需研磨过 80 目筛,保证足够细度使得酸水解作用充分。氨基酸组成加合法可以同时得到氨基酸组成的信息,但测定时间较长,不适合于微藻培养过程的质量监控。

5 高通量组分分析技术

近年来,高通量的微藻组分检测技术得到不断发展。基于红外光谱、拉曼光谱及热重等的检测技术在微藻生物产业得到广泛的应用。

---

① GB/T 5009.9-2008 食品中淀粉的测定

② GB/T 16919-1997 食用螺旋藻粉

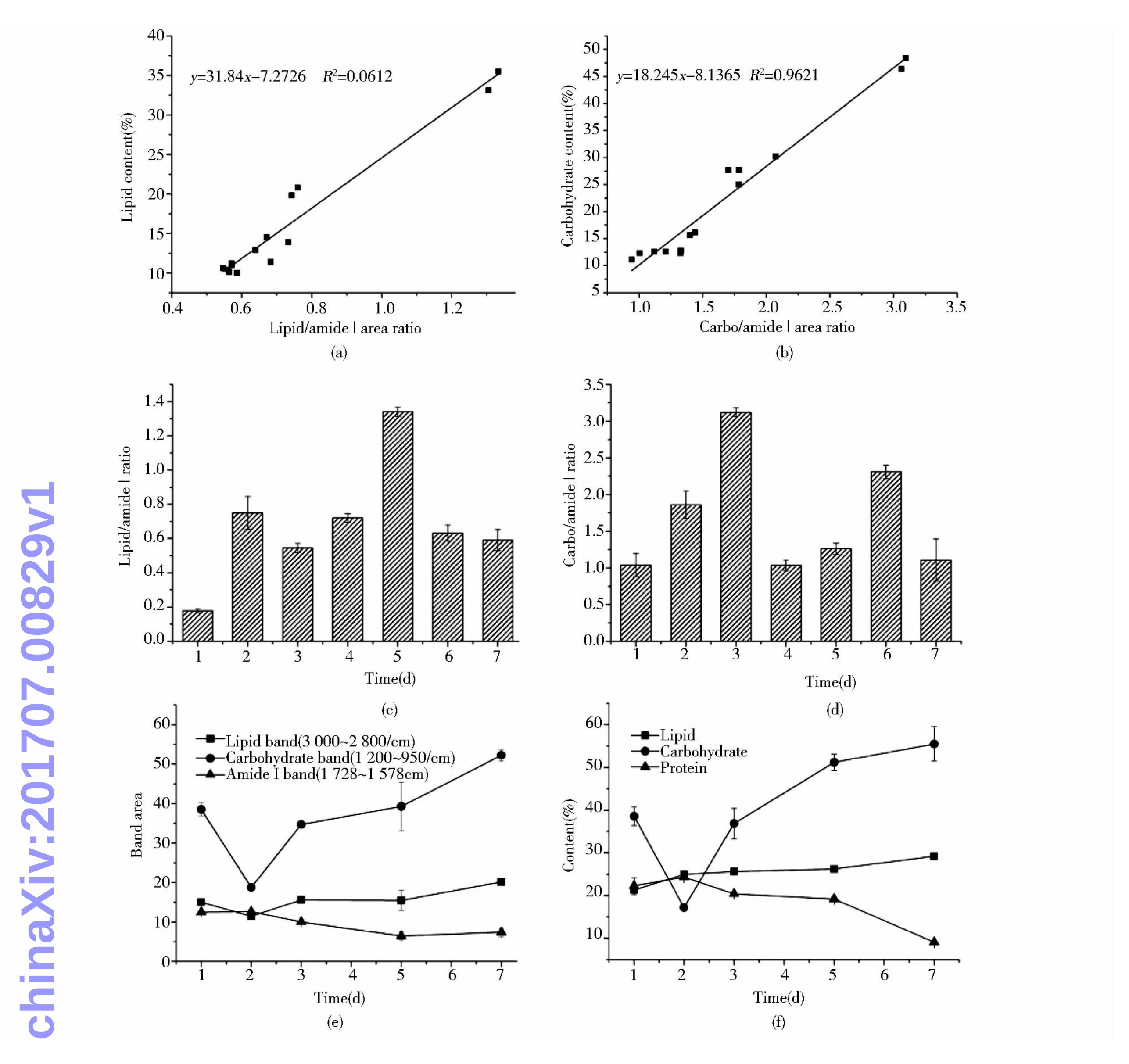


图 4 FTIR 应用于总脂和总糖含量测定(a、b)、藻种筛选(c、d)及培养过程组分监测(e、f)[61]

Fig. 4 The detail information of FTIR application in lipid and carbohydrate determination (a, b), microalgal strains screening (c, d) and monitoring cell composition dynamics (e, f)

The correlation of lipid/amide I or carbo/amide I ratio from FTIR spectrometry and corresponding lipid (a) or carbohydrate (b) content from traditional chemical method;The relative lipid (c) and carbohydrate (d) content of microalgae determined by FTIR spectroscopy. In X-axis the number represents different algal strains. 1: *Porphyridium cruentum*; 2: H16; 3: *Tetraselmis subcordiformis*; 4: *Scenedesmus obliquus*; 5: *Isochrysis* sp.; 6: *Chaetoceros* sp.; 7: *C. pyrenoidosa*. The time-course variation of metabolite contents of *I. zhanjiangensis* measured by traditional chemical method (e) and FTIR (f)

5.1 傅里叶变换红外光谱

傅里叶变换红外光谱(FTIR)属于分子光谱,可用于同时测定细胞内多种物质。细胞内大分子物质如蛋白质、脂类、核酸、多糖等在 FTIR 中红外区域均有吸收,因此对全细胞进行 FTIR 光谱扫描可同时提供各物质特异的振动吸收谱带:3 000 ~2 800/cm 为 C-H 伸缩振动,主要来源于脂类,1 740/cm 为脂和脂肪酸官能团中 C=O 的振动吸收峰;1 650/cm 及 1 540/cm 分别为与蛋白质中 C=O 伸缩振动及 N-H 的弯曲振动;1 200 ~900/cm 为糖类 C-O-C 的振动吸收峰,特征

谱带吸收强度与细胞内组分的含量变化一致。有研究表明,脂质及总糖含量与特征谱带具有良好的相关性,R^2 分别为0.95和0.96[61],从而使FTIR为优良藻种筛选、培养过程中生物组分监控、营养元素限制培养时细胞内碳源的分配等研究方面提供了一种快速的监测方法。FTIR法的优点在于能够同时给出细胞内脂质、总糖、蛋白质的谱图,与其他单一测定组分的方法相比其缺点在于FTIR仅能给出组分的相对含量,难以对组分进行准确定量。

5.2 单细胞拉曼光谱

单细胞拉曼光谱技术实现了无需标记、无损、高通量的活体单细胞单组分及多组分同时检测。目前拉曼光谱已应用于单细胞的油脂、糖(淀粉)及色素等的细胞动态检测。Wang等[62]利用拉曼光谱进行单个活体细胞水平的TAG含量免标记测量,实现了单细胞精度的微藻细胞群体合成TAG过程动态定量监测。Ji等[63]以478 /cm拉曼峰强度作为细胞淀粉含量的定量标记对莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)及小球藻(*C. pyrenoidosa*)进行了淀粉含量检测,结果表明该方法与传统试剂盒法测定结果相关系数(R^2)达0.99。Chiu等[64]利用拉曼光谱单细胞检测技术同时定量*Chlamydomonas* sp. JSC4中脂质和糖的含量研究油脂积累过程,并获得与传统化学方法相媲美的测定结果。Kaczor等[65]利用拉曼成像对雨生红球藻(*H. pluvialis*)内虾青素的分布、浓度及结构进行了原位体内研究。

5.3 热重分析

热重分析在物质的热稳定性、分解过程等研究中有着重要的应用,能准确地测量物质的质量变化及变化的速率。利用热重分析仪可准确测定微藻生物质的灰分含量,与常规马弗炉法相比,所需样品量少,精确度更高。由于微藻生物质各组分的特点,在灰分测定过程中,失重的时间不同,通过质谱分析各物质的失重温度,利用失重曲线的微分线变化可以获得碳水化合物、蛋白质、油脂的相对含量。Liu等[66]建立了一种利用微藻生物质失重曲线微分线变化来判断不同培养条件下物质组成的相对变化方法。

微藻生物质分析平台是微藻生物能源研究的"眼睛",优良的平台技术能够精准监测整个培养过程中各生物质指标的动态变化,能对各方面研究提供准确的指导信息。目前微藻生物质分析技术纷繁多样,造成不同实验室间的研究结果难以比较交流。通过对常用的生物质分析方法的综述与评估,确定最适合的分析方法推进微藻生物质分析平台的标准化。

参考文献

[1] Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. Plant Journal, 2008, 54(4): 621-639.

[2] Chen C Y, Zhao X Q, Yen H W, et al. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. Biochemical Engineering Journal, 2013, 78: 1-10.

[3] Zhang W, Wang J, Wang J, Liu T. Attached cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production. Bioresource Technology, 2014, 158: 329-335.

[4] Del Campo J A, Garcia-Gonzalez M, Guerrero M G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(6): 1163-1174.

[5] Meng Y Y, Jiang J P, Wang H T, et al. The characteristics of TAG and EPA accumulation in *Nannochloropsis oceanica* IMET1 under different nitrogen supply regimes. Bioresource Technology, 2015, 179: 483-489.

[6] Yao C H, Ai J N, Cao X P, et al. Enhancing starch production of a marine green microalga Tetraselmis subcordiformis through nutrient limitation. Bioresource Technology, 2012, 118: 438-444.

[7] Yao C H, Pan Y F, Lu H B, et al. Utilization of recovered nitrogen from hydrothermal carbonization process by *Arthrospira platensis*. Bioresource Technology, 2016, 212: 26-34.

[8] Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, et al. Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, 101(2): 87-96.

[9] Lorenz R T, Cysewski G R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. Trends in Biotechnology, 2000, 18(4): 160-167.

[10] Singh S, Kate B N, Banerjee U C. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An overview. Critical Reviews in Biotechnology, 2005, 25(3): 73-95.

[11] Ward O P, Singh A. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. Process Biochemistry, 2005, 40(12): 3627-3652.

[12] Kay R A. Microalgae as food and supplement. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1991, 30(6): 555-573.

[13] Becker E W. Micro-algae as a source of protein. Biotechnology Advances, 2007, 25(2): 207-210.

[14] Folch J, Lees M and Stanley G H S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. Journal of Biological Chemistry, 1957, 226(1): 497-509.

[15] Bligh E G and Dyer W J. A rapid method for total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959, 37 (8): 911-917.

[16] Fuchs B, Süβ R, Teuber K, et al. Lipid analysis by thin-layer chromatography-A review of the current state. Journal of Chromatography A, 2011, 1218(19): 2754-2774.

[17] Liu J, Liu Y, Wang H, et al. Direct transesterification of fresh microalgal cells. Bioresource Technology, 2015, 176: 284-287.

[18] Wang H, Yao C, Liu Y, et al. Identification of fatty acid biomarkers for quantification of neutral lipids in marine microalgae *Isochrysis zhangjiangensis*. Journal of Applied Phycology, 2015, 27(1): 249-255.

[19] Chen W, Zhang C, Song L, et al. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. Journal of Microbiological Methods, 2009, 77(1): 41-47.

[20] 王海涛, 刘亚男, 曹旭鹏, 等. 尼罗红荧光法快速检测培养过程中湛江等鞭金藻的中性脂. 生物加工过程, 2014, 12(6): 78-83.

Wang H T, Liu Y N, Cao X P, et al. Nile red fluorescence method for rapid measurement of neutral lipids during the cultivation of the marine microalgae *Isochrysis zhangjiangensis*. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2014, 12(6): 78-83.

[21] Wu S, Zhang B, Huang A, et al. Detection of intracellular neutral lipid content in the marine microalgae *Prorocentrum micans* and *Phaeodactylum tricornutum* using Nile red and BODIPY 505/515. Journal of Applied Phycology, 2014, 26(4): 1659-1668.

[22] Rumin J, Bonnefound H, Saint-Jean B, et al. The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8: 42.

[23] 孟迎迎, 王海涛, 薛松, 等. 高效薄层色谱测定湛江等鞭金藻培养过程脂质变化. 微生物学通报, 2014, 41(1): 178-183.

Meng Y Y, Wang H T, Xue S, et al. Lipids analysis of *Isochrysis zhangjiangensis* during cultivation process by HPTLC. Microbiology China, 2014, 41(1): 178-183.

[24] Shen P, Wang H, Pan Y, et al. Identification of characteristic fatty acids to quantify triacylglycerols in microalgae. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 162.

[25] Liu J, Chu Y, Cao X, et al. Rapid transesterification of micro-amount of lipids from microalgae via a micro-mixer reactor. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8: 229.

[26] Lin J T. HPLC separation of acyl lipid classes. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2007, 30: 2005-2020.

[27] Zhu Z, Dane A, Spijksma G, et al, An efficient hydrophilic interaction liquid chromatography separation of 7 phospholipid classes based on a diol column. Journal of Chromatography A, 2012, 1220: 26-34.

[28] Anesi A, Guella G. A fast liquid chromatography-mass Spectrometry methodology for membrane lipid profiling through hydrophilic interaction liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 2015, 1384: 44-52.

[29] Kobayashi N, Noel A E, Barnes A, et al. Rapid detection and quantification of triacylglycerol by HPLC-ELSD in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella Strains*. Lipids, 2013, 48(10): 1035-1049.

[30] Lísa M, Cífková E, Holčapek M. Lipidomic profiling of biological tissues using off-line two-dimensional high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 2011, 1218(31): 5146-5156.

[31] Li M, Baughman E, Roth M R, et al. Quantitative profiling and pattern analysis of triacylglycerol species in *Arabidopsis seeds* by electrospray ionization mass spectrometry. The Plant Journal, 2014, 77(1): 160-172.

[32] Vu S H, Shiva S, Roth M R, et al. Lipid changes after leaf wounding in *Arabidopsis thaliana*: expanded lipidomic data form the basis for lipid co-occurrence analysis. Plant Journal, 2014, 80(4): 728-743.

[33] Danielewicz M A, Anderson L A and Franz A K. Triacylglycerol profiling of microalgae strains for biofuel feedstock by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 401(8): 2609-2616.

[34] Ritchie R J, Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, Methanol and Ethanol Solvents. Photosynthesis Research, 2006, 89(1): 27-41.

[35] Ritchie R J, Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. Photosynthetica, 2008, 46(1): 115-126.

[36] Ördög V, Stirk W A, Bálint P, et al. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella* minutissima cultures. Journal of Applied Phycology, 2012, 24(4): 907-914.

[37] Rodríguez-Bernaldo de Quirós A, Costa H S. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. Journal of Food Composition and Analysis, 2006, 19(2-3): 97-111.

[38] Van Heukelem L, Thomas C S. Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments. Journal of Chromatography A, 2001, 910(1): 31-49.

[39] Guaratini T, Cardozo K H M, Pintoc E, et al. Comparison of diode array and electrochemical detection in the C-30 reverse phase HPLC analysis of algae carotenoids. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2009, 20(9): 1609-1616.

[40] Boussiba S and Vonshak A. Astaxanthin accumulation in the green-alga *Haematococcus pluvialis*. Plant and Cell Physiology, 1991, 32(7): 1077-1082.

[41] Holtin K, Kuehnle M, Rehbein J, et al. Determination of astaxanthin and astaxanthin esters in the microalgae *Haematococcus pluvialis* by LC-(APCI)MS and characterization of predominant carotenoid isomers by NMR spectroscopy. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009, 395(6): 1613-1622.

[42] Chen G, Wang B, Han D, et al. Molecular mechanisms of the coordination between astaxanthin and fatty acid biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). The Plant Journal, 2015, 81(1): 95-107.

[43] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350-356.

[44] Yemm E, Willis A. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. Biochemical Journal, 1954, 57(3): 508.

[45] Laurens L M, Dempster T A, Jones H D, et al. Algal biomass constituent analysis: method uncertainties and investigation of the underlying measuring chemistries. Analytical Chemistry, 2012, 84(4): 1879-1887.

[46] Blakeney A B, Harris P J, Henry R J, et al. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. Carbohydrate Research, 1983, 113(2): 291-299.

[47] Templeton D W, Quinn M, Van Wychen S, et al. Separation and quantification of microalgal carbohydrates. Journal of Chromatography A, 2012, 1270: 225-234.

[48] Honda S, Akao E, Suzuki S, et al. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl5-pyrazolone derivatives. Analytical Biochemistry, 1989, 180(2): 351-357.

[49] Dvořáčková E, Šnóblová M and Hrdlička P. Carbohydrate analysis: From sample preparation to HPLC on different stationary phases coupled with evaporative light - scattering detection. Journal of Separation Science, 2014, 37(4): 323-337.

[50] Busi M V, Barchiesi J, Mart N M, et al. Starch metabolism in green algae. Starch-Stärke, 2014, 66(1-2): 28-40.

[51] Ball S G. The intricate pathway of starch biosynthesis and degradation in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Australian Journal of Chemistry, 2002, 55(2): 49-59.

[52] Rose R, Rose C L, Omi S K, et al. Starch determination by perchloric acid vs enzymes: evaluating the accuracy and precision of six colorimetric methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991, 39(1): 2-11.

[53] Brányiková I, MaršLkov B, Doucha J et al. Microalgae-novel highly efficient starch producers. Biotechnology and Bioengineering, 2011, 108(4): 766-776.

[54] Smith A M, Zeeman S C. Quantification of starch in plant tissues. Nature Protocols, 2006, 1(3): 1342-1345.

[55] Rausch T. The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. Comparison of methods for extracting protein. Hydrobiologia, 1981, 78(3): 237-251.

[56] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 265-275.

[57] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1-2): 248-254.

[58] Brown R E, Jarvis K L, Hyland K J. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. Analytical Biochemistry, 1989, 180(1): 36-139.

[59] López C V G, Garc A M D C C, Fern Ndez F G A, et al. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. Bioresource Technology, 2010, 101(19): 7587-7591.

[60] Lourenço S O, Barbarino E, Lav N P L, et al. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. European Journal of Phycology, 2004, 39(1): 17-32.

[61] Meng Y, Yao C, Xue S, et al. Application of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in determination of microalgal compositions. Bioresource Technology, 2014, 151: 347-354.

[62] Wang T T, Ji Y T, Wang Y, et al. Quantitative dynamics of triacylglycerol accumulation in microalgae populations at single-cell resolution revealed by Raman microspectroscopy. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7: 58.

[63] Ji Y T, He Y H, Cui Y B, et al. Raman spectroscopy provides a rapid, non-invasive method for quantitation of starch in live, unicellular microalgae. Biotechnology Journal, 2014, 9(12): 1512-1518.

[64] Chiu L D, Ho S H, Shimada R, et al. Rapid *in vivo* lipid/carbohydrate quantification of single microalgal cell by Raman spectral imaging to reveal salinity-induced starch-to-lipid shift. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10(1): 9.

[65] Kaczor A, Turnau K and Baranska M. In situ Raman imaging of astaxanthin in a single microalgal cell. Analyst, 2011, 136(6): 1109-1112.

[66] Liu J, Pan Y, Yao C, et al. Determination of ash content and concomitant acquisition of cell compositions in microalgae via thermogravimetric (TG) analysis. Algal Research, 2015, 12: 149-155.

Review and Evaluation of Microalgal Components Determination Methods

MENG Ying-ying[1,2] YAO Chang-hong[1] LIU Jiao[1,3] SHEN Pei-li[1,3] XUE Song[1] YANG Qing[2]
(1 Marine Bioengineering Group, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)
(2 School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)
(3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100084, China)

Abstract Microalgae have been attracted as one of the potential sustainable bioresoucre due to their high photosynthetic efficiency, shorter growth cycle and enrichment of lipids, protein, carbohydrate, carotenoid and so on. Microalgae have high oil yield per unit area compared with other oilseed crops. In recent years, microalgae have been extensively investigated for biodiesel technology and CO_2 emission reduction simultaneously. In addition, microalgae rich in a variety of high-value bioactive substances and have been widely applied in food, medicine and feed fields. The microalgal industry and corresponding research call the standard methods to evaluate the cultivated biomass from aspects. It have been reviewed that the methods to examine the most interested components in quantification and quality prevail in order to promote the standardization for analysis of microalgal components in microalgal field.

Key words Measurement methodology Lipids Pigments Carbohydrates Protein